

Wasserstoff übertragende Fermente in Pflanzenembryonen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main

vorgelegt von

Gerhard Pfeiderer
aus Heilbronn am Neckar

1 9 5 2

VERLAG CHEMIE G.M.B.H. . WEINHEIM (BERGSTRASSE)

- Dekan: Professor Dr. Willibald Diemair
1. Referent: Professor Dr. Richard Kuhn
 2. Referent: Professor Dr. Theodor Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 1952



Die vorliegende Veröffentlichung aus Liebigs Annalen 578. Band, S. 159 (1952) „Über die Reduktion von TTC durch Maissamen“ enthält wesentliche Auszüge meiner Inaugural-Dissertation „Wasserstoff übertragende Fermente in Pflanzenembryonen“ (Frankfurt a. M. 1952).

Meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Richard Kuhn, danke ich herzlich für
sein reges Interesse und für die zahlreichen, wertvollen
Ratschläge, mit denen er diese Arbeit gefördert hat.

Über die Reduktion von TTC durch Maissamen

Von *Richard Kuhn, Gerhard Pfeleiderer und Walter Schulz*

(Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg,
Institut für Chemie)

(Eingegangen am 23. September 1952)

Die Reduktion von Triphenyltetrazolium-chlorid (TTC) durch keimende Samen¹⁾ ist die Grundlage eines Verfahrens²⁾ zur Bestimmung der Keimfähigkeit geworden. Zu den in dieser Hinsicht am besten untersuchten Samen gehört der Mais (*Zea mays*), bei dem sich Embryo und Scutellum leuchtend rot färben. Die vorliegende Untersuchung ist unternommen worden, um die Natur der reduzierenden Fermentsysteme des Scutellums und des Embryos von Maissamen kennenzulernen, die allem Anscheine nach für die Keimfähigkeit besondere Bedeutung besitzen.

Methodik. Maiskörner, die unter 4-maliger Erneuerung des Wassers 48 Stunden gequollen waren, wurden halbiert und in 1-proc. Lösung von TTC in Wasser eingelegt. Zur kolorimetrischen

¹⁾ R. Kuhn und D. Jerchel, Ber. **74**, 949 (1941).

²⁾ G. Lakon, Ber. dtsch. bot. Ges. **LX**, 299, 434 (1942).

Bestimmung des gebildeten Formazans wurde nach verschiedenen Zeiten mit einem Gemisch von Chloroform/Eisessig 1:1 extrahiert.

Wasserstoff-donatoren. Setzt man gleichzeitig mit dem TTC noch Glucose, Bernsteinsäure, Glutathion, Ascorbinsäure und andere Substrate (Tab. 1) zu, so ändert sich an den gebildeten Formazan-Mengen praktisch nichts. Cystein erhöht die Formazanwerte etwas (s. Tab. 1).

Eine Ausnahme-stellung unter den geprüften H_2 -Donatoren nimmt die Citronensäure ein, die in 0,5-proc. Lösung eine Verdoppelung der Farbstoffbildung bewirkt. Höchst auffallend ist es, daß *cis*-Aconitsäure ohne Wirkung ist.

Vergleich von Citronensäure-gehalt und Formazanbildung. In 100 g gequollener Maiskeimlinge (Embryo + Scutellum) fanden wir nach der Pentabrom-acetonmethode 100–140 mg Citronensäure³). 100 g gequollene Maiskeimlinge (herauspräpariert, nicht halbierte Samen) bilden in $5\frac{3}{4}$ Stunden 74 mg und in 22 Stunden 183 mg Formazan. Man erkennt, daß die Menge der natürlich vorkommenden Citronensäure (Mol.gew. 192) ausreichend ist, um die Menge des gebildeten Triphenylformazans (Mol.gew. 300) zu erklären. Diese Betrachtung schließt eine Beteiligung weiterer H_2 -Donatoren nicht aus. Papierchromatographisch konnten wir in wäßrigen Extrakten aus Maiskeimlingen Citronensäure, Äpfelsäure und Glutaminsäure nachweisen⁴).

Dabei bereitete die Trennung von Phosphorsäure und Citronensäure erhebliche Schwierigkeiten. Diese Trennung⁵) gelang erst, als — unter Ausnutzung der Unterschiede in den 2. und 3. Dissoziationskonstanten — die Lösungen der Natriumsalze vor dem Auftragen auf Whatman Nr. I auf $p_H = 9$ eingestellt wurden und absteigend mit n-Propanol (60%), konz. Ammoniak (30%) und Wasser (10%) entwickelt wurde. Unter diesen Bedingungen fanden wir: Phosphorsäure $R_F = 0,21$, Citronensäure $R_F = 0,26$, Äpfelsäure $R_F = 0,36$. Die Sichtbarmachung erfolgte retentiometrisch mit Kupferacetat in Tetrahydrofuran nach Th. Wieland⁶) (Rubeanwasserstoff).

Hemmstoffe. Bei frisch geerntetem Mais wurde die Formazanbildung durch Kaliumcyanid bei $p_H = 6$ maximal um 30%, bei 1 Jahr alten Samen maximal um 50% gehemmt (Tab. 2). Kohlenoxyd (100%) hemmte bei frischem Mais nach 15 Stunden um 10 bis 15%, bei 1 Jahr altem Samen nach 70 Stunden um 50–60% (Tab. 3). Diese Hemmungen sind bezogen auf die unter N_2 (100%) erhaltenen Farbstoff-Mengen. Unter Luft wird weniger Farbstoff gebildet als unter N_2 , eine Erscheinung, die bei tierischen Zellen

³) Vgl. K. Täufel und F. Krusen, Biochem. Z. **322**, 275 (1952) (umgerechnet auf 100 g Trockensubstanz finden wir 200–280 mg Citronensäure).

⁴) Vgl. L. Mapson und D. R. Goddard, Biochem. J. **49**, 592 (1951).

⁵) G. Pfeleiderer, Wasserstoff übertragende Fermente in Pflanzenembryonen. Dissertation Univ. Frankfurt (Main) 1952.

⁶) Th. Wieland und U. Feld, Angew. Chem. **63**, 258 (1951).

und Geweben schon länger bekannt ist. Es fällt auf (Tab. 4), daß 1% CO noch etwa gleichstark hemmt wie 100% CO und daß erst bei 0,1% CO der Ausgangswert wieder erreicht wird. Angesichts der verhältnismäßig langen Versuchszeiten, bei denen ein Einfluß auf Vorgänge der Zell-vermehrung denkbar scheint, ist eine Deutung der CO-Versuche nicht leicht. Immerhin sind auch in Versuchen mit Extrakten aus Keimlingen Hemmungen durch CO beobachtet worden.

Mit Phenanthrolin und mit 8-Oxychinolin ließen sich Hemmungen bis zu 50% erzielen (Tab. 2). Mit Jodessigsäure konnte man bei jungen Samen bis zu 45% hemmen, durch Kombination von Kaliumcyanid mit Jodessigsäure bis zu 80% (Tab. 2).

Aktivierung durch Cumarin. Schon durch eine m/100-Lösung von Cumarin wird die Formazan-bildung auf das Doppelte bis Dreifache gesteigert (Tab. 5). Als H₂-Donator wirkt das Lacton offenbar nicht.

Vergleich von Reduktionsvermögen und Keimfähigkeit. Bei der von G. Lakon²⁾ entwickelten topographischen Bestimmung der Keimfähigkeit von Samen mit Hilfe von TTC kommt es darauf an, ob im Scutellum und im Embryo Bezirke auftreten, in denen die Formazan-bildung ausbleibt. Sind die ungefärbten Bezirke gering, so besteht noch volle Keimfähigkeit wie bei guten Samen, deren Scutellum und Embryo durchgehend rot werden.

In den von uns durchgeführten Hemmungs-versuchen ist es nie vorgekommen, daß im Bereich des Scutellums und des Embryos gewisse Bezirke nicht mehr angefärbt worden wären. Es trat vielmehr eine topographisch gleichmäßige Verringerung der Farbstoff-bildung in Erscheinung. Im Falle der Aktivierung durch Cumarin nahm die Farbstärke in Scutellum und Embryo gleichermaßen zu.

Die Frage, ob zwischen Keimfähigkeit und Reduktionsvermögen (gebildeter Farbstoffmenge) eine Beziehung besteht, ist für die topographische Methode von G. Lakon, bei der es auf die Größe und Lage der Reduktions-bezirke ankommt, nicht von unmittelbarer Bedeutung. Diese Frage hat uns dennoch beschäftigt und sie ist nach den vorliegenden Versuchen klar zu verneinen:

a) m/1000-Jodessigsäure hemmte an halbierten Maissamen die Formazan-bildung um 40% und war ohne jede Hemmwirkung auf die Entwicklung der Wurzeln bei ganzen Samen.

b) m/100-Cumarin steigerte die Formazanbildung um 100% und unterdrückte die Wurzelbildung restlos.

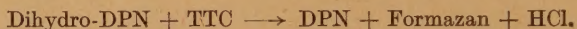
Es ist verständlich, daß Samen, die keinerlei reduzierende Fermentsysteme mehr besitzen, nicht mehr keimfähig sein können. Umgekehrt ist es aber gut vorstellbar, daß reduzierende Fermentsysteme noch vorhanden sind, obwohl die Keimfähigkeit bereits

verlorengegangen ist⁷⁾. Auf solche Verhältnisse, die bei der Warmwasserbehandlung von Weizenkörnern auftreten, hat W. Fuchs⁸⁾ aufmerksam gemacht.

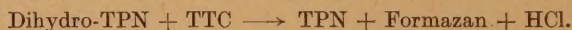
Mechanismus der Formazanbildung in Maissamen. Erhitzt man den von uns verwendeten badischen Landmais trocken 35 Min. auf 60°, dann ist er nicht mehr keimfähig und er bildet keine Spur von Formazan mehr, auch nicht nach Zusatz von Citrat. Fügt man jedoch Dihydro-DPN (Dihydro-cozymase) oder Dihydro-TPN (Dihydro-triphosphopyridin-nucleotid) zu, so erfolgt wieder kräftige Rotfärbung (Tab. 7). Mit Maiskeimextrakten, die 12 Min. auf 60° erhitzt waren, findet man dasselbe.

Die Erklärung ist folgende: Dihydro-DPN und Dihydro-TPN reagieren in wäßriger Lösung mit TTC nicht.

Bei Zusatz von Diaphorase I (nach F. B. Straub⁹⁾ aus Schweineherzen rein dargestellt) erfolgt jedoch, wie mit F. Linke¹⁰⁾ gefunden wurde, unter Rotfärbung die Umsetzung



Diaphorase II (aus Löwenbräuhefe nach E. Haas¹¹⁾ dargestellt) katalysiert, wie wir fanden, die Reaktion



Es ist somit zu schließen, daß beim Erhitzen auf 60°, wobei die Maissamen die Fähigkeit zur Reduktion von TTC verlieren, die Diaphorasen aktiv bleiben. Die Dehydrasen, denen es obliegt, den Wasserstoff ihrer Substrate auf DPN und TPN zu übertragen, werden jedoch beim trockenen Erhitzen auf 60° zerstört. Setzt man Dihydro-DPN oder Dihydro-TPN zu, so kommt es wieder zur Farbstoffbildung. DPN und TPN zeigen diese Wirkung nicht.

Anders liegen die Verhältnisse bei wäßrigen Extrakten aus Maiskeimlingen, die sehr bald ihr Reduktionsvermögen für TTC einbüßen. Hier kann man durch Zusatz von DPN und von TPN eine sehr starke Steigerung der Formazan-Mengen erzielen. Woraus zu schließen ist, daß unter diesen Bedingungen funktionsfähige Dehydrasen erhalten bleiben, aber die Cofermente I und II einer (enzymatischen) Zerstörung anheimfallen.

⁷⁾ Vgl. dazu C. O. Jensen, W. Sacks und F. A. Baldanski, *Science* **113**, 63 (1951).

⁸⁾ W. Fuchs und A. Beiler, *Ber. dtsch. bot. Ges.* **LXI**, 164 (1944) und *Nachrichtenbl. f. d. dtsch. Pflanzenschutzdienst* **2**, Heft 7/8 (1948).

⁹⁾ *Biochem. J.* **33**, 787 (1939).

¹⁰⁾ *Reduzierende Fermentsysteme und Triphenyl-tetrazoliumchlorid*, Dissertation Univ. Mainz (1950); vgl. A. F. Brodie und J. S. Gots, *Sci.* **114**, 40 (1951).

¹¹⁾ *Biochem. Z.* **298**, 378 (1938).

In Maiskeimlingen haben wir sowohl DPN wie TPN nachgewiesen. Über die präparative Isolierung von TPN aus Weizenkeimen wird in einer besonderen Abhandlung¹²⁾ berichtet.

Wenn auf 60° erhitzte Maissamen nach Zusatz von Dihydro-DPN wieder TTC reduzieren, so erlangen sie doch nicht wieder die Fähigkeit, Wurzeln zu bilden. Es ist also, wie man erwarten durfte, auf so einfache Weise nicht möglich, „tote“ Samen wieder „lebendig“ zu machen. Dabei ist zu bedenken, daß auch das schmermetallhaltige Fermentsystem der Maissamen, auf dessen Anwesenheit die teilweise Hemmbarkeit der Formazan-bildung durch KCN deutet, nach dem Erhitzen auf 60° nicht mehr funktioniert.

Beschreibung der Versuche

Wasserstoff-donatoren für TTC-Reduktion. „Badischer Landmais“ neuester Ernte wurde mit Leitungswasser mehrfach gewaschen, danach 48 Stunden lang darin eingequollen, wobei das überstehende Quellwasser täglich 3-mal erneuert wurde.

Je etwa 30 gequollene Körner wurden auf Filtrierpapier getrocknet, mit einem scharfen Messer median durch den Keimling halbiert, gewogen und in 100 ccm-Erlenmeyerkölbchen mit 30 ccm doppelt dest. Wasser bzw. wäßriger Substratlösung überschichtet. Alle Lösungen waren auf p_H 6 eingestellt. Zu jedem Ansatz gaben wir zuletzt 300 mg mehrfach aus Alkohol/Äther umkristallisiertes Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC), durchspülten das Kölbchen mit Stickstoff und verschlossen es fest mit einem Gummistopfen.

Nach 15-stündigem Stehen bei Raumtemperatur, unter Ausschluß von Licht, wurden die überstehenden Lösungen abgegossen und die Kornhälften rasch mit Chloroform/Eisessig (Vol. 1:1) abgespült. Das gebildete Formazan ließ sich anschließend durch 5–6-maliges Digerieren mit je 25 ccm Chloroform/Eisessig (je 6 Stunden) in Lösung bringen. Die Schnittflächen der Körner waren zuletzt fast weiß.

Zur kolorimetrischen Bestimmung wurden die Extrakte filtriert, mit dem Lösungsmittelgemisch auf 150 ccm verdünnt und in einem Dubosq-Kolorimeter gegen Lösung von reinem Triphenylformazan gemessen.

Man erkennt die Sonderstellung der Citronensäure, die in einer Konzentration von 0,5% bei mehrmals wiederholten Versuchen eine Verdoppelung der Formazanwerte gegenüber dem Wasserwert bewirkte.

Citronensäuregehalt gequollener Maiskeimlinge. 86 g wassergesättigte Keimlinge aus Maiskörnern, nach 48-stündigem Einquellen herauspräpariert, wurden in 180 ccm Wasser von 100° geworfen und etwa 3 Min. zwischen 90° und 100° gehalten. Nach Abgießen der Lösung zerrieben wir die Keime mit Hilfe von Quarzsand in einem Porzellanmörser und kochten den Gewebepulver nochmals, unter Zusatz der vorher abgetrennten Lösung, auf. In einer hochtourigen Zentrifuge (15000 Touren/Min.) ließen sich nach Abheben der Fettschicht noch 100 ccm

¹²⁾ G. Pfeleiderer und W. Schulz unveröffentlicht.

Tab. I

Formazanbildung halbiert, gequollener Maiskörner (je 56—60 Hälften), Lösungen mit NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Versuchszeit 15 Stunden, Zimmertemperatur

Zusatz	Wasserwert	Formazan gef. (mg)		
		0,01 %	0,1 %	0,5 %
d,l-Äpfelsäure . . .	1,87	1,80	1,54	1,65
Malonsäure	1,87	1,89	1,81	1,59
Cystein	1,87	1,96	2,32	2,62
Glycerinphosphat .	1,87	1,76	1,80	1,80
Fumarsäure	1,96	2,08	1,92	1,72
Maleinsäure	1,96	1,84	2,23	2,26
Bernsteinsäure . . .	1,96	2,02	2,21	2,15
Citronensäure . . .	1,96	2,21	2,62	4,05
Na-Citrat	1,96	2,25	2,47	3,78
Hexosediphosphat .	1,56	1,63	1,74	1,57
Inosit	1,56	1,80	1,72	1,72
Phytin	1,56	1,57	1,93	1,78
Robinsonester . . .	1,56	1,61	1,54	1,38
Brenztraubensäure .	1,56	1,56	1,74	1,45
Oxalessigsäure . . .	1,45	1,40	1,52	1,57
l(+)-Glutaminsäure	1,45	1,42	1,29	1,20
Glutathion	1,54	1,50	1,64	1,50
Ascorbinsäure . . .	1,47	1,56	1,56	—
trans-Aconitsäure . .	1,47	1,62	1,56	1,50
cis-Aconitsäure . . .	1,47	1,17	1,17	1,25
	2,21	2,12	2,57	2,15
Glukose	1,47	1,50	1,48	1,53
Äthyl-alkohol . . .	2,16	2,20	—	2,30
	2,16	2,18	—	2,22

gewinnen. Aus dieser Lösung wurden die Codehydrasen und verschiedene Phosphorsäureester, deren Isolierung wir gleichzeitig betrieben, an 10 g zuvor mit heißer Salzsäure gewaschener Holzkohle adsorbiert. Man saugte die Lösung ab und wusch die Kohle mit Wasser. Filtrat+Waschwasser enthielten 59 mg Citronensäure*). Die gesamte zur Extraktion angewandte Flüssigkeitsmenge (180 ccm für 86 g Keimlinge) enthielt also 106 mg Citronensäure, d. h. 123 mg/100 g wassergesättigter Keime.

In einem weiteren Versuch extrahierten wir unter den gleichen Bedingungen 130 g wassergesättigte Maiskeime; zuerst mit 260 ccm, dann nochmals mit 100 ccm Wasser. Im Gesamtextrakt von 250 ccm fanden sich nach Behandlung mit Holzkohle 126 mg Citronensäure*), das sind 182 mg berechnet auf das ursprüngliche Volumen (360 ccm) oder 140 mg/100 g feuchte Keime. Eine Extraktion mit verd. Salzsäure (unlösliches Zitrat) ergab keine höheren Citronensäurewerte. Untersuchungen mit Quellwasser, das i. V. eingeeengt war, zeigten, daß aus 1 kg Maiskörnern schon nach 24 Stunden 12 mg Citronensäure herausdiffundiert waren.

Formazanbildung und Citronensäuregehalt. Nach 48-stündigem Einquellen der Körner wurden die Maisembryonen samt Scutella mit dem Messer herausgeschält, halbiert und je 50—60 Hälften (3,5 g) mit 30 ccm 1-proc. wäßriger

*) C. Martius, H. 257, 39 (1939).

TTC-Lösung überschichtet. In verschiedenen Zeitabschnitten wurden die überstehenden Lösungen abgegossen und das in den Keimlingen gebildete Formazan mit Chloroform/Eisessig extrahiert. Die kolorimetrisch ermittelten Werte betragen (für je 3,5 g halbierte Keimlinge)

nach $5\frac{3}{4}$ Stdn. 2,59 mg Formazan = 74 mg/100 g wassergesättigte Keime

nach 11 Stdn. 4,00 mg Formazan = 114 mg/100 g wassergesättigte Keime

nach 22 Stdn. 6,42 mg Formazan = 183 mg/100 g wassergesättigte Keime.

Die in 100 g wassergesättigten Maiskeimlingen gefundene Citronensäure (Durchschnitt 130 mg) könnte bei einfacher Dehydrierung (über Isocitronensäure mit der Dehydrase) 210 mg Formazan bilden, innerhalb des Krebs-Zyklus sogar 630 mg (3 Mol H_2 = 3 Mol Formazan, je 1 Mol Citronensäure).

Nachweis von Citronen-, Äpfel- und Glutaminsäure in Maiskeimextrakt

Die Anwesenheit von freiem Phosphat in Maiskeimextrakt störte den retentiometrischen Nachweis von Citrat wegen der Ähnlichkeit der beiden R_F -Werte.

In Vorversuchen mit künstlichen Phosphat-Citrat-Gemischen zeigte sich, daß beim Auftragen der freien Säuren die oberste Trennungsgrenze bei einem Molverhältnis von 2:1 lag⁶).

Folgende Lösungsmittelgemische erwiesen sich als günstig:

1. n-Propanol (60 Vol.), konz. Ammoniak (30 Vol.), Wasser (10 Vol.);

2. Äthylglykol (60 Vol.), konz. Ammoniak (30 Vol.), Wasser (10 Vol.).

Nachdem wir jedoch die freien Säuren vor der Chromatographie mit Soda-lösung auf p_H 9 (Phenolphthalein) eingestellt hatten, konnten wir noch Gemische von 4 Mol Phosphorsäure und 1 Mol Zitronensäure in n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (Vol. 60:30:10) einwandfrei voneinander trennen.

Bei unseren Untersuchungen mit Maiskeimextrakt wurden z. B. 185 g Maiskeimlinge mit 555 cm Wasser aufgekocht und mit Quarzsand zerrieben. Die Abtrennung des Extraktes erfolgte mit Hilfe eines Koliertuches. Der Rückstand wurde nochmals mit 370 cm Wasser ausgezogen. Aus beiden Extraktionen resultierten nach dem Zentrifugieren 680 cm Lösung. Beim Versetzen mit 1020 cm Alkohol fiel gelöste Stärke. Die filtrierte Lösung engten wir i. V. auf 250 cm ein und setzten bei p_H 6,6 Bleiacetatlösung zu, bis kein neuer Niederschlag mehr auftrat.

Die abzentrifugierte Fällung wurde zur Beseitigung der Aminosäuren mit 80-proc. Alkohol gewaschen, danach in wäßriger Suspension mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach Abtrennung des Bleisulfids, durch Faltenfilter, beseitigen wir im Filtrat durch kräftiges Lüften den überschüssigen Schwefelwasserstoff. Die mit 2n-Soda neutralisierte Lösung (Phenolphthalein) wurde i. V. bis zu einer Citronensäure-konzentration von 0,5% eingengt und Proben davon in absteigender Chromatographie mit n-Propanol/Ammoniak/Wasser entwickelt. Die Kennzeichnung der Säuren erfolgte, wie anfangs erwähnt, nach der retentiometrischen Methode von Th. Wieland⁶) mit Kupferacetat in Tetrahydrofuran und anschließendem Übersprühen mit acetonischem Rubeanwasserstoff.

Die gefundenen R_F -Werte betrugen 0,03, 0,21, 0,27 und 0,38. Unter gleichen Bedingungen fanden wir für Phosphorsäure 0,21, für Citronensäure 0,26, für Äpfelsäure 0,36.

Das Filtrat der Bleisalzfällung aus Maiskeimextrakt zeigte eine starke Ninhydrinreaktion. Die Trennung der Aminosäuren erfolgte in 2 dimensionaler, absteigender Chromatographie. Das erste Lösungsmittelgemisch enthielt 75 Vol. sek. Butanol, 10 Vol. Wasser und 15 Vol. Ameisensäure, das zweite, nach der Drehung des Chromatogrammbogens um 90°, Phenol (mit Wasser gesättigt). Das Vorkommen von Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure konnte im Vergleich mit künstlichen Gemischen dieser Aminosäuren sicher festgestellt werden.

Einfluß verschiedener Fermenthemmstoffe auf die Formazanbildung

30 gequollene Maiskörner (15 g) wurden halbiert und mit 25 ccm 1-proc. wäßriger TTC-Lösung bzw. mit TTC-Lösung, die Hemmstoff enthielt, überschichtet. Alle Lösungen waren wieder auf p_H 6 eingestellt.

Nach 15-stündigem Stehen unter N_2 bei Lichtausschluß wurde das in den Keimlingen gebildete Formazan mit Chloroform/Eisessig extrahiert und kolorimetriert.

Tab. 2

Formazanbildung halbiertter, gequollener Maiskörner unter Einwirkung spezifischer Fermenthemmstoffe. Versuchszeit 15 Stunden. Zimmertemperatur

Konz.	Formazan gef. (mg)		
	Monojodessigsäure	HCN	Phenanthrolin-HCl
ohne Hemmstoff . .	1,26*)	1,54	1,80
n/10000	1,23	—	—
n/1000	0,84	—	—
n/500	—	1,56	—
n/100	0,74	0,96	1,11
n/50	0,71	1,08	0,99
n/10	0,73	1,08	0,93

*) Durchschnitt aus 3 Parallelbestimmungen.

Da bei der Reduktion von 1 Mol TTC 1 Mol HCl frei wird, die das p_H der Zelle und damit die Reaktionsgeschwindigkeit der Fermente auf die Dauer beeinflußt, wiederholten wir einzelne Versuche in gepufferter TTC-Lösung bzw. gepufferter TTC-Lösung+Hemmstoff, ohne dabei prinzipielle Unterschiede in der Wirkung der Hemmstoffe finden zu können.

In einem Versuch waren die Formazanwerte für 1 Jahr alte Samen nach 15 Stunden:

in Wasser	= 3,13 mg	
in m/100 KCN	= 2,39 mg	= Hemmung 23,5%
in m/20 Phosphatpuffer, p_H 7,52	= 4,85 mg	
in m/20 Phosphatpuffer + KCN	= 3,64 mg	= Hemmung 25%

Andere Versuche ergeben nach 15 Stunden:

in Wasser	= 1,28 mg	Formazan	
in m/50 KCN (p_H 6,0)	= 0,56 mg	„	= 56,2% Hemmung
in m/20 Phosphatpuffer, p_H 6,8	= 1,18 mg	„	
in m/20 Phosphatpuffer + m/50 KCN	= 0,66 mg	„	= 44% Hemmung

Tab. 3

Formazanbildung halbiertter Maiskörner (60 Hälften) unter Einwirkung von CO ; Zimmertemperatur

	nach 15 Stunden	Formazan gef. (mg)	
		nach 15 Stunden (24 Stunden unter CO inkubiert)	nach 30 Stunden
unter N_2	1,66	1,66	2,36
unter CO	1,50	1,40	1,96

Alle Zahlen sind Durchschnittswerte aus 3 Parallelbestimmungen.

Wurde die wäßrige TTC-Lösung zu Beginn des Versuchs mit CO (aus Bombe) gesättigt, so war bei frisch geernteten Maiskörnern (15 g halbierte, gequollene Körner) eine schwache, mit zunehmender Reaktionszeit wachsende Hemmung der Formazanbildung zu beobachten.

Bei 1—2 Jahre alten Samen war der Einfluß von CO auf die Formazanbildung stärker. Aus zahlreichen Reagenzglasversuchen mit variierten CO-Luft-gemischen seien folgende Ergebnisse herausgegriffen.

Tab. 4

Formazanbildung halbiertter Maiskörner (8 Hälften) unter Einwirkung von CO, Temp. 27°

	Formazan gef. (mg.)	
	nach 40 Stdn.	% Hemmung
unter Luft	0,89	
unter CO 100 %	0,63	29
unter CO 10 %	0,66	26
unter CO 1 %	0,66	26
unter CO 0,1 %	0,86	—

Die CO-Hemmung war also bis zu einer Konzentration von 1% herab etwa gleichbleibend.

Ein Gemisch von Jodacetat und KCN senkte die Formazanwerte auf 20% des Wasserwertes:

15 g halbierte, gequollene Maiskörner bildeten unter den üblichen Bedingungen (Zimmertemperatur, 15 Stunden Reaktionszeit in 30 ccm 1-proc. wäßriger Lösung) 1,87 mg Formazan. Wurde ein zweiter Ansatz vor der TTC-Reaktion mit einem Gemisch von 15 ccm m/10-Jodessigsäure und 15 ccm m/10-KCN (p_H 6) 6 Stunden inkubiert und dann erst TTC in fester Form zugegeben, so betrug der Formazanwert nach 15 Stunden nur 0,38 mg.

Aktivierung durch Cumarin. Obwohl Cumarin nach der Auffassung verschiedener Autoren wie Jodessigsäure mit SH-Gruppen-tragenden Fermenten reagieren soll, beobachteten wir in unseren Versuchen mit halben Maiskörnern stets eine Steigerung der Formazanbildung. Besonders deutlich wurde dieser Effekt, wenn die Maiskörner schon in $\frac{1}{100}$ m-Cumarinlösung eingequollen waren. Unter diesen Bedingungen zeigt Tab. 5 den zeitlichen Verlauf der Formazanbildung durch je 15 g halbierte Kernhälften in wäßriger bzw. m/100-Cumarinlösung.

Tab. 5

Aktivierung durch Cumarin

Stunden	mg Triphenylformazan gefunden	
	Wasser	$\frac{1}{100}$ m-Cumarin
3	0,90	1,01
5	1,11	2,03
11	1,65	3,32
21	2,74	7,65
5	1,35	2,40
10	2,07	4,17
$22\frac{1}{2}$	3,49	9,10

Wirkung von Cumarin in m/10-Phosphatpuffer von p_H 7.5

Wir ließen die Maiskörner in m/10-Phosphatpuffer bzw. in m/10-Phosphatpuffer, der m/100-Cumarin enthielt, 48 Stunden lang einquellen. Die TTC-Reaktion bestimmten wir mit 30 halbierten Körnern (15,0—15,4 g) und 20 ccm frischem m/10-Phosphat + 200 mg TTC bzw. m/10-Phosphat, das m/100-Cumarin und 200 mg TTC enthielt.

Stunden	mg Triphenylformazan gefunden	
	m/10-Phosphat	m/10-Phosphat + m/100-Cumarin
5	2,23	3,15
11	4,37	8,00
20½	8,72	14,78

Ließ man Maiskörner 24 Stunden in m/20-Phosphatpuffer von p_H 7,2, der steigende Konzentrationen von Cumarin enthielt, quellen, so war die Formazanbildung nach weiteren 20½ Stunden bei 30 halbierten Körnern (15,1—15,2 g) folgendermaßen:

Cumarin	0	m/1000	m/500	m/200	m/100
	(Puffer allein)				
gef. Formazan (mg)	4,37	4,47	4,80	5,50	6,85

Keimfähigkeit und Reduktionsvermögen

Je 50 Körner Badischer Landmais neuester Ernte wurden in 100 ccm dest. Wasser, bzw. wäßriger Hemmstofflösung 48 Stunden lang eingequollen. Alle Lösungen waren auf p_H 6 eingestellt.

Nach 48 Stunden brachten wir 10 Körner jeder Probe in eine Petrischale auf Filtrierpapier, das mit der gleichen Lösung getränkt war, um bei 28° (thermostanter Raum) die Keimfähigkeit zu untersuchen. Nach 3 Tagen waren in den Wasserproben 17 von 20 Körnern angekeimt, mit mehreren zentimeterlangen Wurzeln.

Außerdem wurden 30 gequollene Körner jeder Probe, wie mehrfach beschrieben, halbiert, gewogen und in Erlenmeyerkölbchen mit 20 ccm Wasser bzw. Hemmstofflösung überschichtet. Jede Lösung wurde schließlich mit 200 mg TTC beschickt.

Tab. 6

Formazanbildung (nach 20 Stunden) und Keimfähigkeit

Lösung	Konz.	gekeimt angewandt	Gewicht der Körner	Formazan gef. (mg)
Wasser	—	7/10	15,2	2,86
Wasser	—	10/10	15,7	2,70
Cumarin	m/150	0/10	15,1	5,64
(d,l) Parasorbinsäure .	m/100	0/10	15,0	2,17
Wasser	—	7/10	13,6	2,56
Jodessigsäure	m/50	0/10	14,4	0,90
„	m/100	2/10	15,5	1,08
„	m/1000	7/10	14,5	1,54

In m/50-Cumarin fand keine Spur von Keimung mehr statt, obwohl der Formazanwert verdoppelt war; hingegen keimten die Körner noch in m/1000-Jodessigsäure normal trotz starker Hemmung der Reduktionsfähigkeit.

TTC-Versuche mit abgetöteten Maiskörnern. Je 4 gequollene Maiskörner wurden halbiert in Reagenzgläser gefüllt und ohne weiteren Zusatz 35 Min. lang in ein Wasserbad von 60° eingetaucht. Nach dem Abkühlen überschichteten wir die Kornhälften einer Probe mit 4 ccm 1-proc. wäßriger TTC-Lösung, andere Proben versetzten wir mit TTC-Lösung, die zudem noch hydriertes DPN bzw. hydriertes TPN enthielt. Die Cofermente waren 70% rein und waren nach der Schnellmethode von S. Gutcho und D. Stewart¹³⁾ mit Natriumdithionit hydriert worden. Dabei ist darauf zu achten, daß überschüssiges Dithionit nach vollendeter Hydrierung der Cofermente völlig zerstört wird, da es augenblicklich TTC reduziert.

Die Reagenzgläser wurden zuletzt mit Stickstoff durchspült und mit Gummistopfen verschlossen. Nach 15-stündigem Stehen unter Lichtausschluß waren die Kornhälften der Wasserprobe (Nr. 1) völlig ungefärbt, während die Dihydrocoferment enthaltenden Proben über Embryo und Scutellum verteilt die normale Formazanfärbung zeigten (Tab. 7).

Tab. 7

Formazanbildung halbiert, auf 60° (35 Min.) erwärmter Maiskörner (je 8/2). Reaktionszeit 15 Stunden. Zimmertemperatur

Probe-Nr.	Dihydro-DPN mg/4 ccm	Dihydro-TPN mg/4 ccm	mg-Formazan gef.
1	—	—	0,00
2	—	1,4	0,16
3	—	1,4	0,18
4	3,5	—	0,09

Erwärmt man Maiskeimextrakt (aus 1 Gew.-Teil Keimlingen und 2 Gew.-Teilen Wasser) 12 Min. auf 60°, so scheint auch in diesem Fall die Diaphorase teilweise aktiv zu bleiben, während die Dehydrasen größtenteils zerstört werden.

2 ccm Extrakt, mit Wasser auf 4 ccm verdünnt und mit 40 mg TTC versetzt, bildete ohne Erhitzen nach 12 Stunden 0,42 mg Formazan, nach 12 Min. langsamem Erwärmen auf 60° 0,07 mg Formazan und nach Zugabe von 2 mg Dihydro-DPN 1,07 mg Formazan.

Enzymatische Reduktion von TTC durch isolierte, TPN-spezifische Fermente. Robisonester wurde als Ca-Salz aus Bierhefe nach der Methode von O. Warburg und W. Christian¹⁴⁾ gewonnen und für den Test als Na-Salz (mit Na-Oxalat) in Lösung gebracht. Das TPN-spezifische, neue gelbe Ferment von E. Haas¹⁵⁾ aus Hefemacerationssaft reinigten wir durch Ammonsulfat und Alkohol-fällung. Das Zwischenferment gewannen wir nach dem vereinfachten Verfahren von C. A. LePage und O. C. Mueller¹⁶⁾ ebenfalls aus Bierhefe. TPN wurde aus Weizenkeimen in einer Reinheit von 75% isoliert¹²⁾.

In die Ansatzbirne des Thunberg-Röhrchens pipettierten wir 0,5 ccm 1-proc. TTC-Lösung und 0,3 ccm Robisonester-lösung (etwa 10 mg Na-Salz). Der Haupt-raum enthielt im vollständigen Fermenttest 0,3 ccm TPN = 100 γ, 0,7 ccm Diaphoraselösung = etwa 9 mg Protein, 0,3 ccm Zwischenfermentlösung = 2 mg Protein und 1,0 ccm m/2 Phosphatpuffer p_H 7,4. Mit Wasser wurde jeweils auf ein Gesamtvolumen von 3,5 ccm aufgefüllt. Die Thunberg-Röhrchen wurden nach dem Einpipettieren der Fermentlösungen mit N₂ durchspült, auf 12 mm Hg evakuiert und im Warburg-Thermostaten bei 38° geschüttelt. Enthielt das Glas alle

¹³⁾ Analyt. Chem. **20**, 1185 (1948).

¹⁴⁾ Bio. Z. **254**, 438 (1932).

¹⁵⁾ Bio. Z. **298**, 278 (1938).

¹⁶⁾ J. biol. Chem. **180**, 975 (1949).

Testbestandteile, so war nach wenigen Minuten eine deutliche Formazanbildung zu beobachten. Fehlte dagegen 1 Testbestandteil, so blieben die Lösungen nach $\frac{1}{2}$ Stunde noch völlig farblos. Auch mit Natriumdithionit hydriertes TPN übertrug beim Schütteln im Thunberg-Gefäß (p_H 7,4, 38%) seinen Wasserstoff mit Hilfe des Haasschen Fermentes auf TTC unter Bildung von Formazan.

Aktivierung von Maiskeimextrakt durch DPN und TPN. 60 g Maiskeimlinge, aus gequollenen Samen mit dem Messer herauspräpariert, wurden unter Zusatz von 70 ccm m/20-Phosphatpuffer vom p_H 7,0 und etwas Quarzsand etwa $\frac{1}{2}$ Stunde zerrieben. Der Gewebebrei ließ sich mit Hilfe eines Koliertuches fast trocken pressen. Der resultierende Extrakt (60 ccm) wurde auf der hochtourigen Zentrifuge geklärt.

Wir pipettierten je 10 ccm Extrakt in 100 ccm-Erlenmeyerkölbchen, fügten zu jeder Probe 50 mg festes TTC und bestimmten die Formazanbildung bei 25° (Thermostat) unter N_2 mit und ohne Zusatz von DPN und TPN. Während der $\frac{1}{2}$ -stündigen Reaktionszeit wurden die Kölbchen kräftig umgeschüttelt. Nach dem Versuchsende fällten wir die Eiweißkörper mit Eisessig und extrahierten aus der wäßrigen Lösung mit Chloroform das gebildete Formazan. Die kolorimetrischen Bestimmungen ergaben folgende Werte:

	mg Formazan gef.
10 ccm Extrakt ohne Zusatz	0,85
10 ccm „ + 5 mg Cozymase (70% rein)	1,34
10 ccm „ + 3 mg TPN (70%)	1,49
10 ccm „ 5 mg DPN + 3 mg TPN (je 70% rein) . .	1,44

LEBENS LAUF

Ich bin am 20. Februar 1921 in Heilbronn a. Neckar als Sohn des Amtsgerichtsdirektors Dr. Hans Pfeiderer und seiner Ehefrau Alice, geb. Pakscher, geboren.

In meiner Geburtsstadt besuchte ich vom Frühjahr 1927 bis 1931 die Volksschule und anschließend 8 Jahre lang das Gymnasium. Nach bestandener Reifeprüfung (Frühjahr 1939) erfüllte ich meine $1\frac{1}{2}$ jährige Arbeitsdienstpflicht und begann im Herbst desselben Jahres mit dem Chemie-Studium an der Universität München. Oktober 1940 erhielt ich meine Einberufung zur Wehrmacht. Erst im Frühjahr 1946 konnte ich das unterbrochene Studium an der Universität Heidelberg fortsetzen. Mai 1947 bestand ich die Diplomchemiker-Vorprüfung und Juni 1949 die Diplomchemiker-Hauptprüfung. Anschließend an letztere wechselte ich an das Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, über, um dort unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Richard Kuhn meine Diplom- und Doktor-Arbeit durchzuführen.

Gerhard Pfeiderer.

